Aus dem Hygienischen Institut der Universität Berlin
(Direktor: Professor Dr. Zeiss).
(Abteilungsleiter: Prof. Dr. med. F. Weigmann)

Untersuchungen über die Wirkung menschlichen Speichels auf pathogene und apathogene Keime, sowie über den im Speichel wirksamen Stoff

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des

Medizinischen Doktorgrades

an der

Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin

vorgelegt von

Hildegard Noeske
aus Berlin

Tag der Promotion: 31. 7. 1939

Druck: Karl u. Richard Hoffmann, Charlottenburg, Schillerstraße 44

M 129

Gedruckt mit Genehmigung

der

Medizinischen Fakultät der Universität Berlin

Dekan: Prof. Dr. Siebeck
Referent: Prof. Dr. med. F. Weigmann
Korreferent: Prof. Dr. med. H. Zeiss

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Untersuchungen über die Wirkung menschlichen Speichels auf pathogene und apathogene Keime, sowie über den im Speichel wirksamen Stoff.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550804_0201

I.

Untersuchungen über die Wirkung menschlichen Speichels Speichels auf pathogene und apathogene Keime.

Dold und Weigmann[1]) stellten fest, daß die mit echten und stark virulenten toxischen Diphtheriebazillen beimpfte Rachen- und Nasenschleimhaut von Affen und Meerschweinchen nicht an Diphtherie erkrankte. Die Ergebnisse sind schon insofern bemerkenswert, als gerade Meerschweinchen und Affen wegen ihrer geringen Widerstandsfähigkeit gegen parenteral eingeführtes Diphtherietoxin bekannt sind. Auch wurden diese Versuche bestätigt durch weitere Befunde an gesunden Affen, die, wie zufällig erkannt wurde, spontan Diphtheriebazillen auf ihrer Rachen- und Nasenschleimhaut beherbergten[2]). Die aus dem Rachen- und Nasenraum gezüchteten diphtheroiden Stäbchen erwiesen sich virulent für Meerschweinchen bei parenteraler Verimpfung. Der Gedanke lag also nahe, in dem Sekret der Rachen- und Nasenschleimhaut ein antibakterielles Agens zu vermuten.

Die Annahme einer bakteriziden Wirkung des menschlichen Speichels ist schon 1896 von Sanarelli und Florain[3]) ausgesprochen worden; jedoch konnte vön diesen Autoren eine solche Wirkung auf Pneumokokken und auf Diphtheriebazillen nicht festgestellt werden. Auch Hugenschmidt, van der Reis, Krüger[4]), Seitz[5]) und andere konnten dem Speichel keine ausgesprochene antibakterielle Eigenschaft zuschreiben.

Marguerite Bordet[6]) fand im Hundespeichel einen auf Saprophyten lytisch wirkenden Stoff. Derartige Stoffe wurden auch von Fleming[7]) im menschlichen Serum und in anderen menschlichen und tierischen Flüssigkeiten nachgewiesen.

Dold und Weigmann[8]) wiesen an zahlreichen Versuchsreihen eine entwicklungshemmende, bis keimtötende

Wirkung des menschlichen Speichels auf Diphtheriebazillen nach.

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine antibakterielle Wirkung des Speichels mehrerer gesunder Personen auf verschiedene pathogene und apathogene Keime festzustellen. Da die Wirkung des flüssigen Speichels im Reagenzglas auf Diphtheriebakterien bereits von anderer Seite geprüft worden war, wurden die vorliegenden Untersuchungen in der Weise erweitert, daß die von Dold und Weigmann bereits angewandte Methode, den Speichel mit Agar zu mischen, in Anwendung gebracht wurde. Es hatte sich in den Versuchen der genannten Autoren gezeigt, daß der Zusatz von 50 % Speichel zum Agar die antibakterielle Wirkung des Speichels am besten zur Geltung kommen ließ, ohne daß dabei die Konsistenz des Agars so weit herabgesetzt wurde, daß der Vorteil des festen Nährbodens verloren ging. Die Verwendung des Speichelagars bot, gegenüber dem flüssigen Speichel, den Vorteil, daß die im frischen Speichel vorhandenen Mundhöhlenbakterien im Agar fixiert wurden und daher bei der Beurteilung des Wachstums der aufgesäten Bakterien weniger störend ins Gewicht fielen und ferner, daß man die Wirkung des Speichels beobachten kann, ohne eine Zersetzung des Speichels befürchten zu müssen. Außer Diphtheriebazillen der drei Typen: gravis, mitis und intermedius wurden Pseudodiphtheriebazillen, B. anthracis, B. subtilis, B. coli, B. Proteus; B. prodigiosum, Staphylococcus aureus, Micrococcus tetragenes, Pneumokokken und Streptokokken auf diese Weise der Speichelwirkung unterworfen.

Wirkung des menschlichen Speichels auf Diphtheriebazillen.

Die Diphterietypen wurden differenziert nach ihrem Kolonienwachstum auf 2,5 %igem Nähragar unter Zusatz von 8 % defibriniertem Hammelblut und 0,01 % Cystin, sowie nach ihrer Säurebildung in 0,01 %iger Cystin-Bouillon mit einem Zusatz von 1 % Traubenzucker, bezw. Dextrin oder Stärke. Die Wirkung des frischen rohen Speichels wurde verglichen mit der des durch Kochen oder

½stündiges Erhitzen bei 56° inaktivierten, sowie des filtrierten Speichels der gleichen Person. Der zur Untersuchung gelangte frisch entleerte aktive Speichel wurde mit flüßigem, auf etwa 50° abgekühltem, Cystin-Agar (Cystin 0,01 %, Agar 3 %ig) 1 : 1 gut vermischt und in kleine Petrischalen ausgegossen, bei einer Schichtdicke von ½ cm.

Um eine Kontrolle für das jeweilige Wachstum des unter Speichelwirkung gestellten Stammes zu erhalten, wurde dieser gleichzeitig auf einen Cystin-Agar verimpft, der an Stelle des Speichels physiologische Kochsalzlösung enthielt. Die erstarrten, getrockneten Platten wurden mit Bakterien von einer 24stündigen Blut-Cystin-Agarkultur (Hammelblut 8 %, Cystin 0,01 %, Agar 2,5 %ig) in möglichst feinem Ausstrich beimpft. Die beimpften Nährböden wurden bei 37° gehalten, und 24,—48— und 72 stündlich auf eingetretenes Wachstum der aufgeimpften Kulturen untersucht; ferner wurden Präparate angefertigt, um festzustellen, daß das Wachstum auch sicher von den aufgeimpften Keimen stammte.

Die Diphteriebazillen wachsen auf Cystin-Agar in durchscheinenden Kolonien. Ein Zusatz von Cystin zu dem Nähragar wurde gewählt, um den Kolonien ein besseres Wachstum zu ermöglichen, als auf dem reinen 3 %igen Agar.

Zunächst wurde die Wirkung menschlichen Speichels auf Diphteriebazillen und Pseudodiphteriebazillen geprüft. Die Stämme wurden aus Nasen- und Rachenabstrichen frischer Krankheitsfälle gewonnen, zum Teil wurden äuch Einzelkulturen angelegt.

22 Diphtheriestämme verschiedener Typen und 2 Pseudodiphtheriestämme wurden bei mehrfacher Wiederholung unter Einwirkung von 14 verschiedenen Speicheln gestellt. Aus den angestellten Versuchen ergab sich nun, daß der rohe Speichel die Fähigkeit besaß, alle aufgeimpften Diphtheriestämme in ihrem Wachstum zu hemmen. Es zeigte sich jedoch, daß die Speichelwirkung einzelner Personen bei Vergleichsuntersuchungen und bei Einwirkung auf dieselben Stämme verschieden stark war.

Aus Tabelle 1 geht hervor, daß Speichel W kein Wachstum der aufgeimpften gravis-Keime zuließ, während Spei-

chel N. die Wachstumsentfaltung der aufgetragenen Stämme wenig zu hindern vermochte. Beide Speichel aber standen unter gleichen Versuchsbedingungen und wurden zur selben Zeit untersucht.

Tabelle I.

Einwirkung von Speichel auf Diphtheriebazillen.

Speichel	Di.-Stamm	50 %iger Rohspeichel-Agar			50 %iger phys. NaCl-Agar		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
W.	T. gravis 65 Ra	0	0	0	++++	++++	++++
	T. gravis 65 Na	0	0	0	++++	++++	++++
	T. gr vis 1206	0	0	0	++++	++++	++++
	T. Pseudodi. 1	0	0	0	+++	+++	+++
N.	T. gravis 65 Ra	+	+	+	++++	++++	++++
	T. gravis 65 Na	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	T. gravis 1206	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	T. Pseudodi. 1	++	++	++	+++	+++	+++

0 = kein Wachstum.
+ bis ++++ = schwaches bis kräftiges Wachstum.

Auch konnte eine Schwankung in der Stärke der Entwicklungshemmung zu verschiedenen Zeiten bei derselben Person beobachtet werden. Bei einer derartigen Resistenzminderung des Speichels fand sich dann häufig „Erkältung" der betreffenden Person. Dies war der Fall bei Speichel M. und B. M. und B. litten zur Zeit der Versuchsanordnung am 3. 2. 36 (M.), bzw. am 25. 1. 36 (B,) an einem Rachenkatarrh. (Tabelle II.)

Tabelle II.

Schwankung in der Stärke der Entwicklungshemmung des Speichels.

	Speichel	Di.-Stamm	50 %iger Rohspeichel-Agar			50 %iger phys. NaCl-Agar		
			24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
16. 12. 1935	W.	T. gravis 17	±	±	±	++++	++++	++++
13. 1. 1936			0	0	0	++++	++++	++++
14. 1. 1936			±	±	±	++++	++++	++++
25. 1. 1936	M.	T. gravis 77	0	0	0	++++	++++	++++
3. 2. 1936			±	+	+	++++	++++	++++
7. 2. 1936			0	0	0	++++	++++	++++
25. 1. 1936	B.	T. mitis 36	++	+++	+++	++++	++++	++++
31. 1. 1936			+	++	+++	++++	++++	++++
3. 2. 1936			0	0	0	++++	++++	++++

Eine geringere bakterienhemmende Eigenschaft machte sich auch in der Weise kenntlich, daß wohl nach 24stündiger Bebrütung kein oder nur geringes Wachstum der Kulturen vorhanden war, die Keime aber nach 48stündigem und 72stündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37 ° üppiges Wachstum entfalten. Bei besonders gering wirksamen Speicheln den Di.-Bazillen gegenüber konnte dagegen schon nach 24stündiger Bebrütung recht gute Keimentfaltung bemerkt werden. Die Beispiele in Tabelle III lassen eine geringe keimhemmende Eigenschaft des Speichels Kr. erkennen. Noch weniger antibakteriell wirksam war Speichel B., wie aus Tabelle III ersichtlich ist.

Tabelle III.

Geringe antibakterielle Speichelwirkung.

Speichel	Di.-Stamm	50%iger Rohspeichel-Agar			50%iger phys. NaCl-Agar		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Kr.	T. gravis 77	0	+	+	++++	++++	++++
	T. gravis 36	+	++	++	++++	++++	++++
B.	T, gravis 189	++	+++	++++	++++	++++	++++
	T. gravis 190	++	+++	++++	++++	++++	++++

Bei den Untersuchungen wurden andererseits Speichel angetroffen, die den Diphtheriebazillen gegenüber eine so stark antibakterielle Wirkung entfalteten, daß sie ein Wachstum der Keime nicht zuließen. Speichel W. in Tabelle I sowie Speichel M. und S. in Tabelle IV geben ein Beispiel einer derartigen Abwehrfähigkeit.

Tabelle IV.

Bakterienhemmende Wirkung des Speichels.

Speichel	Di.-Stamm	50%iger Rohspeichel-Agar			50%iger phys. NaCl-Agar		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
M.	T. gravis 280	0	0	0	++++	++++	++++
	T. gravis 77	0	0	0	++++	++++	++++
	T. mitis 36	0	0	0	++++	++++	++++
S.	T. gravis 280	0	0	0	++++	++++	++++
	T. gravis 77	0	0	0	++++	++++	++++
	T. mitis 36	0	0	0	++++	++++	++++

Dagegen machte sich neben der Speichelwirkung auch die Widerstandsfähigkeit der einzelnen Stämme geltend, sodaß eine geringere Wirksamkeit auch des sonst gut antibakteriell wirkenden Speichels besonders kräftigen Diphtheriebazillen gegenüber zu verzeichnen war. Die einzelnen Typen der Diphtheriebazillen zeigten, in Bezug der Widerstandsfähigkeit, keinen durchgreifenden Unterschied. Tabelle V gibt ein Beispiel der entwicklungshemmenden Wirkung des Speichels W. auf die drei Diphtherietypen, sowie gegen Pseudodiphtheriebazillen.

Tabelle V.

Entwicklungshemmende Wirkung des Speichels auf Diphtherie-Typ: gravis, mitis, intermedius und auf Pseudodiphtheriebazillen.

Speichel	Di.-Stamm	50 %iger Rohspeichel-Agar			50 %iger phys. NaCl-Agar		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
W. 24. 1. 36	T. gravis 357	0	0	0	++++	++++	++++
	T. mitis 34	0	0	0	++++	++++	++++
	T. intermedius 29	0	0	0	++++	++++	++++
	Pseudodi. Ps. 1	0	0	0	+++	+++	+++
	Pseudodi. Ps. 2	0	0	0	+++	+++	+++

Wirkung des frischen Speichels auf Bacillus anthracis und B. subtilis.

In ähnlicher Weise, wie auf Diphtheriebazillen, wurde nun auch die Wirkung des menschlichen Speichels auf andere Keime untersucht.

Milzbrand- und Subtilisbazillen wachsen auf Cystin-Agar sehr üppig und lassen daher den Unterschied ihres Wachstums auf den Rohspeichel-Platten gegenüber den Kontrollen besonders deutlich erkennen. Milzbrand- und Subtilisbazillen wurden schon nach 24 Stunden durch fast alle Speichel im Wachstum vollständig unterdrückt (Tab. VI) oder so stark gehemmt, daß die auf den Kontrollen üppig wachsenden Kolonien auf den Speichelplatten nur als hauchartiges, zartes Wachstum bemerkt werden konnten.

Tabelle VI.

Antibakterielle Wirkung des frischen Speichels auf Bacillus anthracis und B. subtilis.

Speichel	Stamm	50 %iger Rohspeichel-Agar			50 %iger phys. NaCl-Agar		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
W.	Milzbrand	0	0	0	++++	++++	++++
	Subtilis	0	0	0	++++	++++	++++
N.	Milzbrand	0	0	0	++++	++++	++++
	Subtilis	0	0	0	++++	++++	++++

Wirkung des rohen Speichels auf Bacterium coli, B. Proteus und B. prodigiosum.

Auch Colibazillen, auf Cystin-Agar gut wachsend, wurden von frischem Speichel stark gehemmt; ihr Wachstum konnte aber nicht, wie bei Milzbrand- und Subtilisbazillen, vollständig unterdrückt werden. Das Wachstum auf den Speichelplatten war aber viel zarter als auf den Kontrollnährböden. Noch geringer erwies sich die Wirkung des frischen Speichels auf Bacterium Proteus.

Von den 14 zur Untersuchung gelangten Speicheln besaß bei häufiger Wiederholung der Versuchsanordnungen keiner die Fähigkeit, der Wachstumsentfaltung von Bacterium Proteus völlig entgegenzuwirken. Das Wachstum auf den Rohspeichel-Platten war auch hierbei wieder sehr zart.

In Tabelle VII ist ein Teil der Versuchsergebnisse zusammengefaßt.

Tabelle VII.

Wirkung des Speichels auf Bacterium coli und B. Proteus.

Speichel	Stamm	50%iger Rohspeichel-Agar			50%iger phys. NaCl-Agar		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
W.	Coli	+	+	++	++++	++++	++++
	Proteus	++	+++	+++	++++	++++	++++
N.	Coli	+	+	+	++++	++++	++++
	Proteus	++	++	++	++++	++++	++++

Bacterium prodigiosum wurde nach 24stündiger Bebrütung bei 37 ° von einigen Speicheln gut gehemmt, von anderen nur wenig. Hielt man aber die beimpften Speichelplatten bei Zimmertemperatur von 22 °, erwies sich der bei Körpertemperatur auf prodigiosum gut hemmend wirkende Speichel in seiner Leistung so herabgesetzt, daß die nun rot wachsenden Keime ein besonders üppiges Wachstum darboten. Daraus geht hervor, daß eine Temperatur bei 37 ° optimal ist für eine Wirkungsentfaltung des Speichels. Bacterium prodigiosum vermochte auf Agar, der an Stelle des Speichels physiologische Kochsalzlösung enthält, sowohl bei 37 ° als auch bei 22 ° üppiges Wachstum zu entfalten, wie auch aus Tabelle VIII hervorgeht.

Tabelle VIII.
Wirkungsentfaltung des Speichels auf Bacterium prodigiosum bei 37 ° und bei 22 °.

Speichel	Temperatur	50%iger Rohspeichel-Agar			50%iger phys. NaCl-Agar		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
W.	37 °	+	+	+	++++	++++	++++
	22 °	++++	++++	++++	++++	++++	++++
N.	37 °	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	22 °	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Wirkung des rohen Speichels auf Staphylococcus aureus und auf Micrococcus tetragenes.

In ähnlicher Weise wurde auch die Speichelwirkung auf verschiedene Kokkenarten untersucht.

Der mit Staphylococcus aureus beimpfte Frischspeichel-Agar zeigte bei gut wirksamen Speicheln wohl eine Unterdrückung des Wachstums der aufgeimpften Keime nach 24stündiger Bebrütung bei 37 °. Die Keime entwickelten sich aber nach 48stündiger, stärker nach 72stündiger Bebrütung. Bei den auch auf andere Bakterien weniger gut hemmend wirkenden Speicheln konnte mäßig gute bis gute

Keimentwicklung schon nach 24stündiger Speicheleinwirkung erkannt werden. Bei allen war ein Unterschied zwischen den Rohspeichel-Agrarplatten und den Kochsalzkontrollen zu bemerken. Die Kontroll-Nährböden wiesen üppiges Wachstum großer Kolonien auf, im Gegensatz zu dem weit geringeren, zarteren Kolonien-Wachstum der Rohspeichel-Platten.

Micrococcus tetragenes unter Speichelwirkung gestellt, verhielt sich ähnlich wie die aufgeimpften Staphylokokken-Kolonien. Von stark antibakteriell wirksamen Speicheln wohl nach 24 Stunden gehemmt, konnte Micrococcus tetragenes sich nach 48stündiger und 72stündiger Bebrütung bei Körpertemperatur doch noch gut entwickeln. Nach Einwirkung weniger wirksamen Speichels zeigte sich auch diesen Kokken gegenüber mäßig gutes Wachstum schon nach 24 Stunden.

Tabelle IX gibt ein Beispiel für die Wachstumsentfaltung von Staphylococcus aureus und Micrococcus tetragenes unter Einfluß von 2 wirksamen Speicheln und einem auch auf andere Bakterien weniger wirksamen Speichel.

Tabelle IX.

Speicheleinwirkung auf Staphylococcus aureus und Micrococcus tetragenes.

Speichel	Stamm	50%iger Rohspeichel-Agar			50%iger phys. NaCl-Agar		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
D.	Staphyl.	0	++	+++	++++	++++	++++
	Tetrag.	0	++	+++	++++	++++	++++
Ma.	Staphyl.	0	+++	+++	++++	++++	++++
	Tetrag.	0	++	+++	++++	++++	++++
Mi.	Staphyl.	++	+++	++++	++++	++++	++++
	Tetrag.	+	+	+	++++	++++	++++

Wirkung des rohen Speichels auf Pneumokokken und Streptokokken.

Pneumokokken und Streptokokken werden auch im Speichel gesunder Personen häufig angetroffen und können doch zugleich pathogene Bedeutung erlangen. So sollte in mehrfachen Versuchsreihen auch das Verhalten dieser

Keime nach mehrstündiger Einwirkung frischen rohen Speichels auf diese Kokken geprüft werden.

Als optimaler Nährboden für eine gute Keimentwicklung der Pneumokokken und Streptokokken erwies sich Pferdeblut-Agar (defibriniertes Pferdeblut 8 %, Agar 3 %ig). So wurde auch für die Untersuchung einer antibakteriellen Wirkung des menschlichen Speichels auf die genannten Bakterien als Nährbodenzusatz 8 %iger Pferdeblut-Agar an Stelle des Cystin-Agars benutzt, zu 50 % mit dem zu prüfenden Speichel vermischt. Pferdeblut-Agar zu 50 % mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt, ergab den Kontrollnährboden. Pneumokokken wie Streptokokken wuchsen auf diesem Nährboden in kleinen tautropfenartigen Kolonien. Zur Beimpfung gelangten 10 Pneumokokken-Stämme der Typen I, II, III, zum Teil von frischen Krankheitsfällen stammend. Bei allen 15 zur Untersuchung gelangten Speicheln wurde bei mehrfacher Wiederholung das gleiche Ergebnis erzielt. Die Frischspeichel-Platten wiesen nicht das geringste Wachstum der aufgeimpften Stämme auf. Die Kochsalz-Kontrollplatten hingegen boten gutes Wachstum der Pneumokokkenkeime dar. Dasselbe Bild wiederholte sich bei allen zur Untersuchung gelangten Speicheln. (Tabelle X).

Tabelle X.

Antibakterielle Wirkung des Rohspeichels auf Pneumokokken.

Speichel	Stamm	50%iger Rohspeichel-Agar		50%iger phys. NaCl-Agar-Kontrolle	
		24 h	48 h	24 h	48 h
B.	I	0	0	++++	++++
	II	0	0	++++	++++
	III	0	0	++++	++++
	19	0	0	++++	++++
	8	0	0	++++	++++
	86	0	0	++++	++++
	5	0	0	++++	++++
	6	0	0	++++	++++
M.	I	0	0	++++	++++
	II	0	0	++++	++++
	III	0	0	++++	++++
	19	0	0	++++	++++
	8	0	0	++++	++++
	86	0	0	++++	++++
	5	0	0	++++	++++
	6	0	0	++++	++++

Streptokokken, darunter auch hämolytische Streptokokken, wurden wie Pneumokokken einer 24stündigen Pferdeblut-Agarkultur entnommen. Auch hier war, wie auf Pneumokokken, völlige antibakterielle Wirkung des frischen Speichels zu verzeichnen. Die Kochsalz-Pferdeblut-Agarkontrollen hingegen wiesen stets gutes Wachstum der aufgeimpften Keime auf.

Es wurden auch in diesen Versuchsreihen wieder Speichel angetroffen, die mit Pferdeblut-Agar zu Nährböden verarbeitet, eine Wachstumsentfaltung der aufgeimpften Streptokokkenkeime nicht völlig unterdrücken konnten. Trotzdem aber konnte Speichelwirkung vermutet werden, da diese Platten ein hauchartiges zartes Wachstum aufwiesen im Gegensatz zu dem üppigen Wachstum auf dem Agar, der an Stelle des Speichels mit physiologischer Kochsalzlösung versetzt worden war. Tabelle XI stellt einen Teil der Versuchsergebnisse über die Einwirkung rohen Speichels auf Streptokokkenkeime dar.

Tabelle XI.
Antibakterielle Wirkung des Rohspeichels auf Streptokokken.

Speichel	Stamm	50%iger Rohspeichel-Agar		50%iger phys. NaCl-Agar	
		24 h	48 h	24 h	48 h
Do.	Str. E.	0	0	++++	++++
	Str. M.	0	0	++++	++++
	Str. I	0	0	++++	++++
	Str- II	0	0	++++	++++
H.	Str. E.	0	0	++++	++++
	Str. M.	0	0	++++	++++
	Str, I	0	0	++++	++++
	Str. II	0	0	++++	++++
Mi.	Str. E.	0	0	++++	++++
	Str. M.	0	0	++++	++++
	Str. I.	0	0	++++	++++
	Str. II	0	0	++++	++++

Die geschilderten Untersuchungen hatten zunächst nur ergeben, daß eine Entwicklungshemmung der auf dem Speichelagar aufgetragenen Keime stattgefunden hatte. Um nun zu prüfen, inwieweit auch eine bakterizide Wirkung sich dabei geltend machte, wurden die beimpften Rohspeichel-

Platten, die nach Bebrütung kein Wachstum aufwiesen, mit Hilfe einer Platinöse oberflächlich abgeschabt und eine Uebertragung auf Blut-Cystin-Agar, bzw. Pferdeblut-Agar vorgenommen. Ein Wachstum auf diesen derart beimpften Blut-Agarnährböden blieb nach Bebrütung bei 37° aus, ein Zeichen, daß die auf die Speichelnährböden gebrachten Keime abgetötet worden waren. Auch im angefertigten Präparat waren Bakterien nicht mehr vorhanden. Die Sporenbildner (Milzbrand, Subtilis) hingegen, obgleich unter Speicheleinwirkung völlig gehemmt, auch im gefärbten Präparat nicht nachweisbar, entwickelten nach Abschaben der Speichelplatten und Beimpfung von Blut-Agarnährböden noch Wachstum. Also haben sich die Sporen lebend erhalten.

Auch sei noch bemerkt, daß bei der Beimpfung der Speichelnährböden die Menge der aufgeimpften Keime eine Rolle spielt.

Die Aussaat muß in feinem Strich erfolgen, um ein Aufkommen der Keime nicht mit aufgetragenem Material zu verwechseln. Auch vermag der gut wirkende Speichel einer zu dichten Aussaat nicht völlig entgegenzuwirken.

Wirkung des gekochten, bei 56° $^1/_2$stündig erhitzten und des filtrierten Speichels auf Di-Bazillen, B. anthracis, B. subtilis, Bacterium coli, B. Proteus, B. prodigiosum, Staphylokokken, Streptokokken und Micrococcus tetragenes.

Im Gegensatz zu der stets hemmenden Wirkung des frisch entleerten rohen Speichels steht die gänzliche Unwirksamkeit des durch Aufkochen oder $^1/_2$stündiges Erhitzen bei 56° inaktivierten Speichels. Als ebenso unwirksam bei der beschriebenen Versuchsanordnung erwies sich der durch Filtrieren mit dem Seitz-Filter unter Stickstoffdruck von 2 atü entkeimte Speichel. Alle untersuchten Bakterienarten boten auf Nährböden mit einem 50 %igen Zusatz des inaktivierten, bzw. filtrierten Speichels üppiges Kolonienwachstum dar, ähnlich wie auf den Kochsalz-Agarkontrollen. (Tabelle XII.)

Tabelle XII.

Einwirkung des rohen Speichels, des filtrierten Speichels und des durch Erhitzen inaktivierten Speichels auf verschiedene Keime.

Speichel	Stamm	50 %iger Rohspeichel-Agar	50 %iger Filtratsp.-Agar	50 %iger Kochsp.-Agar	b. 56° inakt. Sp. + Agar 1 : 1
W.	Typ gravis Di.-357	0	++++	++++	++++
	Milzbrand	0	++++	++++	++++
	Subtilis	0	++++	++++	++++
	Coli	+	++++	++++	++++
	Proteus	++	++++	++++	++++
	Pneumok.	0	++++	++++	++++
	Streptok.	0	++++	++++	++++
	Staphylok.	+	++++	++++	++++
	Tetragenes	+	++++	++++	++++
	Prodigios.	+	++++	++++	++++

Bei der beschriebenen Versuchsanordnung konnte der filtrierte Speichel keine bakterizide Eigenschaft entfalten, während er, wie die von Weigmann und Koehn[9]) veröffentlichten Untersuchungen ergeben hatten, im flüssigen Zustande, unter Bouillonzusatz, wohl noch imstande ist, auf hineingeimpftte Diphtheriekeime antibakteriell zu wirken. So erhob sich die Frage, ob der nicht mehr bakterizid wirkende Filtratspeichel bei gleicher Versuchsanordnung wohl noch die Fähigkeit einer Umwandlung echter Diphtheriebazillen in Pseudodiphtheriebazillen besitzt, wie sie Dold und Weigmann durch Einwirkung frischen unfiltrierten Speichels auf echte Diphtheriebazillen nachweisen konnten. Die beiden Autoren benutzten für diese Untersuchungen einen festen Nährboden aus 9 Teilen Agar und 1 Teil unfiltrierten Speichel.

Umwandlung eines Gravis-Typus.

Als Nährboden für den Umwandlungsversuch wurde 3 %iger Agar verwendet. Der flüssige, auf etwa 50°, abgekühlte Agar wurde zu 50 % mit filtriertem Speichel K. bzw. N. vermischt und in Petrischalen ausgegossen. Die Speichel wurden mit dem Seitz-Filter, unter Verwendung eines Stickstoffdruckes von 2 atü, filtriert. Die Kontroll-

platten enthielten, an Stelle des filtrierten Speichels, gekochten Filtratspeichel bzw. physiologische Kochsalzlösung.

Stamm 10302 wurde in diesem Versuch unter Speicheleinwirkung gestellt. Dieser Stamm wurde aus dem Nasen-Abstrich eines Bazillenträgers gewonnen. Von dem Stamm wurde eine Einzel-Kultur angelegt. Im Gram-Präparat einer 24stündigen Löfflerkultur zeigten die Di-Stäbchen schöne lange Formen und gute Neißerfärbung (Abb. 2.). Der Stamm vergor nach 24 Stunden Stärke, Dextrin und Traubenzucker unter Bildung eines Oberflächenhäutchens. Auf der Blut-Cystinplatte hatten die Kolonien ausgeprägte Gravisform. Das Wachstum war üppig. (Abb. 1.)

Die erstarrten, getrockneten Agarplatten wurden dicht beimpft mit einem Abstrich einer 24stündigen Löfflerkultur des Stammes 10302. Die bei 37 ° bebrüteten Kulturen zeigten durchscheinendes, zartes Wachstum. Nach 24stündiger Bebrütung wurde ein Gram-Präparat, sowie ein Neißerpräparat angefertigt und diese auf eine Formänderung der Di.-Stäbchen mikroskopisch untersucht. Auch wurde nach 24stündiger Bebrütung eine Ueberimpfung der Kolonien auf eine neue Plattenserie vorgenommen; nach jeder dritten Passage wurde außerdem eine Ueberimpfung der Stämme von der letztbeimpften Speichel-Agarplatte auf Blut-Cystinagar zur Untersuchung einer Typenänderung des Stammes ausgeführt.

Nach Einwirkung von Speichel N. bzw. Speichel K. wurden die Formen der Di-Stäbchen mittellang—kurz bis zur 10. Passage. Von der 10. Speichelpassage ab, bis zum Versuchsabschluß, nahmen die Stäbchen kurze Formen an nach Einwirkung von Speichel N.; mittellang-kurze Formen nach Einwirkung von Speichel K. Die Stäbchen erschienen im Gram-Präparat der Speichelagarkultur geballt. Die Neißerfärbung war von der 10. Passage ab atypisch. Auf den Kontrollplatten blieben die Di.-Stäbchen unverändert lang-mittellang und kolbenförmig. Eine Neißerfärbung war nur wechselnd vorhanden.

Nach der 6. Speichelpassage trat erstmalig, sowohl nach Einwirkung von Speichel K., als auch nach Einwirkung von Speichel N., eine Typenänderung auf der 48stündigen Blut-Cystinagarplatte auf. Neben den typischen, üppig wachsen-

den gravis-Kolonien zeigten sich kleine, intermediusartig wachsende Kolonien. (Abb. 5.)

Die gleiche Art der Kolonieformen war auch bis zur 13. Passage nach mehrmaliger Abimpfung von Speichel-Agar auf Blut-Cystinagar zu erkennen. Nach der 13. Speichelpassage traten neben den großen, gravisartig wachsenden und den intermediusartigen Kolonien, große glattrandige (Abb. 6.) Kolonieformen mit schleimiger Oberfläche auf.

Diese 3 verschiedenen Erscheinungsformen wurden isoliert auf eine weitere Blut-Cystinagarplatte gebracht. Die gravisartigen Kolonieformen erwiesen sich nach weiteren Blutcystinagar-Passagen als beständig in der Form und vergoren nach 24h Stärke, Dextrin und Traubenzucker unter Bildung eines Oberflächenhäutchens. Die isolierten glatten Kolonien blieben glatt und vergoren nach 48 Stunden nur Traubenzucker. Diese glattrandigen, schleimigen Kolonien behielten ihre Form auch bei nach nochmaliger Isolierung von der bebrüteten Blut-Cystinplatte auf eine frische Blut-Cystinplatte, vergoren nun aber schon nach 24 Stunden Stärke, Dextrin und Traubenzucker mit Bildung eines Oberflächenhäutchens. Die glatten Kolonien konnten aus den Gärröhrchen wieder rein gezüchtet werden.

Die intermediusartig wachsenden Kolonien zeigten, nach Isolierung nur einer Kolonie dieser Art, eine Aufspaltung in gravis-Form und große glatte Kolonien. Die glatten Kolonien vergoren nach 48 Std. wieder nur Traubenzucker.

Eine nach der 18. Speichelpassage von der N.-Platte angelegte Blut- Cystin- Agarkultur zeigte gravisartig wachsende Kolonien, die nach 24 Stunden neben Oberflächenhautbildung Stärke, Dextrin und Traubenzucker vergoren (Abb. 7.), sowie glatte Kolonien (Abb. 7.) mit schleimiger Oberfläche, die nach 48 Stunden nur Traubenzucker vergoren ohne Oberflächenhautbildung.

Von der K.-Speichelplatte wurden glatte Kolonien erhalten, die sich in der Vergärung wie die glatten Kolonien der N.-Platte verhielten. Im Rasen fanden sich 3 gravisartige Kolonien. Nach der 19. Speichelpassage traten (Abb. 8. u. 9.) ausschließlich glatte Kolonien auf, die nach 48 Stunden ebenfalls nur Traubenzucker vergoren.

Auf den Kochspeichel-Kontrollplatten (Abb. 3.) und den Kochsalz-Kontrollplatten zeigte sich keine Typenänderung der ursprünglichen gravis-Form. Auch das Grampräparat zeigte unverändert die lange Stabchenform. (Abb. 4.).

Um festzustellen, ob sich neben der Typendifferenzierung auch eine Virulenzänderung des Einwirkungsstammes ergeben hatte, wurde je ein 300 g schweres Meerschweinchen mit einer Aufschwemmung (1 Oese/1 ccm NaCl) glatter Kolonien der K.-Platte und der gravisartigen Kolonien der Kochspeichelplatte geimpft. Nach 48 Stunden trat bei dem mit dem Kontrollstamm der Kochspeichelplatte geimpften Tier typischer Di.-Tod ein, während das mit dem Einwirkungsstamm geimpfte Meerschweinchen nach 3 Tagen nur ein Knötchen an der Impfstelle aufwies, das sich im Verlauf von einigen Tagen wieder zurückbildete.

Der filtrierte Speichel bewies also, die Fähigkeit der Umwandlung eines einwandfreien virulenten gravis-Typus über intermediusartige Wuchsform zu pseudoartig wachsenden Kolonien, die aber nach 48 Stunden noch Traubenzucker schwach vergoren, während der gekochte Filtratspeichel die Eigenschafft einer Umwandlung eingebüßt hatte. Die lange, schlanke Form der Diphtheriestäbchen wurde unter Einfluß des aktiven Speichels zu kurzen Formen abgewandelt. (Abb. 10.).

Auf dem Kochspeichel-Agar behielten die Stäbchen ihre ursprüngliche lange Form bei. (Abb. 2. u. 4.).

Abwandlung des gravis-Stammes 10302 durch Speichel N. und K.

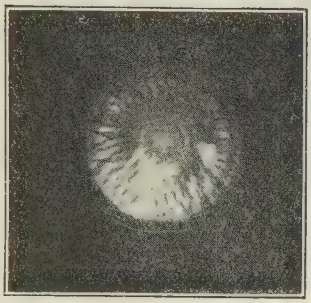


Abb. 1.

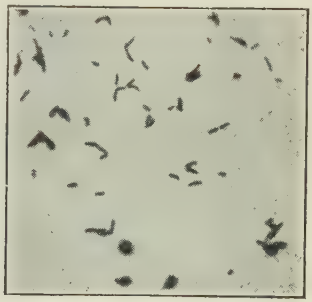


Abb. 2

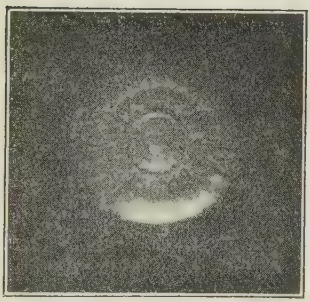


Abb. 3.

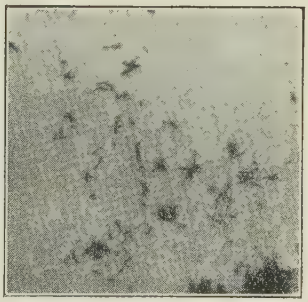


Abb. 4.

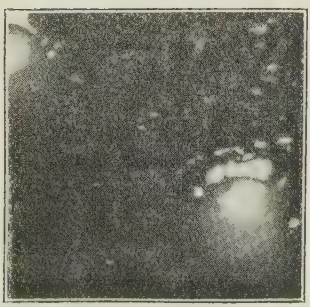


Abb. 5.

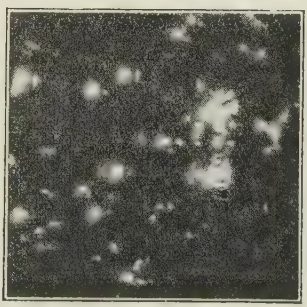


Abb. 6.

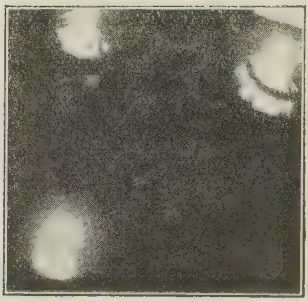


Abb. 7.

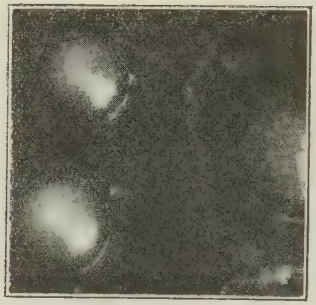


Abb. 8.

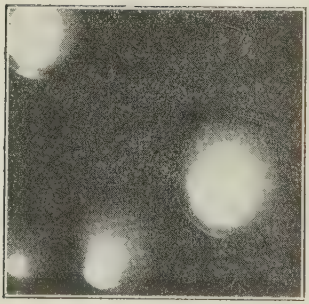


Abb. 9.

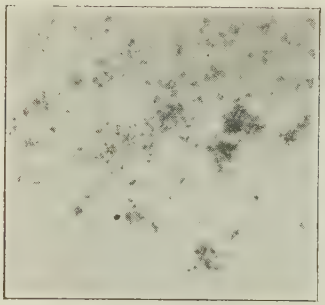


Abb. 10.

Abb. 1. Ursprungsstamm 10302 Typ gravis auf Blut-Cystinagar nach 48stündiger Bebrütung bei 37°.
Abb. 2. Ursprungsstamm 10302 Typ gravis. Grampräparat der Blut-Cystinagarkultur.
Abb. 3. Di.-Stamm 10302 auf Blut-Cystinagar nach der 19. Kochspeichelagar-Passage.
Abb. 4. Di.-Stamm 10302. Grampräparat der Blut-Cystinagarkultur nach der 19. Kochspeichelagar-Passage.
Abb. 5. Abspaltung von intermediusartigen Kolonien nach der 6. N.-Speichelagar-Passage.
Abb. 6. Glattrandige Kolonien neben den gravis-Formen auf Blut-Cystinagar nach der 13. N.-Speichelagar-Passage.
Abb. 7. Pseudoartige Kolonien u. gravis-Formen auf Blut-Cystinagar nach der 18. N.-Speichelagar-Passage.
Abb. 8. Völlige Abwandlung zu Pseudoformen nach der 19. N.-Speichelagar-Passage auf Blut-Cystinagar differenziert.
Abb. 9. Völlige Abwandlung zu Pseudoformen nach der 19. K.-Speichelagar-Passage auf Blut-Cystinagar differenziert.
Abb. 10. Kurze pseudoartige Stäbchen nach der 19. N.- bzw. Speichelagar-Passage. Grampräparät der Blut-Cystinagarkultur.

Die Kolonien der Blut-Cystinagarkultur wurden bei 10-facher Vergrößerung photographiert.

Die nach Gram gefärbten Präparate wurden bei 700-facher Vergrößerung aufgenommen.

Untersuchung einer Abnahme der Speichelwirkung nach längerem Stehen bei 0° und bei 37°

Um ein Nachlassen der Speichelwirkung bei längerem Stehen zu untersuchen, wurde roher frisch entleerter Speichel bei 0° und bei 37° 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden gehalten. Die Proben wurden nach der genannten Zeit zu 50 % mit Cystin-Agar vermischt und zu Platten verarbeitet Als Kontrolle diente Frischspeichel-Agar derselben Person, inaktivierter Speichel- sowie ein Kochsalz-Cystin-Agarnährboden. Die erstarrten, getrockneten Platten

wurden mit verschiedenen Diphtheriestämmen, mit Milzbrand- und Subtilisbazillen beimpft. Die beimpften Nährböden wurden 48 Stunden bebrütet. Die Frischspeichel-Agarplatten wiesen nach 24stündiger und 48stündiger Bebrütung starke keimhemmende Wirkung auf. Ebenso deutlich antibakterielle Wirkung hatte der bei 37° gehaltene Speichel, während die antibakterielle Eigenschaft des bei 0° gehaltenen Speichels weitgehend nachgelassen hatte. So konnte auch bei dieser Versuchsanordnung ein wirksames Agens im Speichel erkannt werden.

Bei längerem Lagern des Speichels war auch eine Wirkung auf die eigenen Mundbakterien zu verzeichnen. Für diese Versuchsreihen wurden Speichel-Agarplatten in gleicher Weise, wie eben beschrieben, hergestellt; aber unbeimpft 48 Stunden bebrütet. Die Nährböden mit dem 50 %igen Zusatz von Frischspeichel, von 0°-Speichel und von 37°-Speichel wurden nach 24-stündigem und nach 48-stündigem Bebrüten bei Körpertemperatur mikroskopisch auf ihren Koloniengehalt untersucht.

Die mit den frisch entleerten rohen Speicheln zu Agarnährböden sofort verarbeiteten Platten ließen nach 24-stündiger Bebrütung im Agar viele Bakterienkolonien erkennen. Der bei 0° gehaltene Speichel zeigte nur verlangsamte Wirkung, sodaß auch nach 72 stündigem und nach 96-stündigem Lagern noch Kolonien von Mundbakterien innerhalb der gegossenen, bebrüteten Speichel-Agarnährböden kenntlich waren.

Die 37°-Speichel-Agarplatten zeigten starke Abnahme der Mundbakterien schon nach 24-stündigem Lagern. Nach 48-stündigem Stehen bei 37° waren kaum noch Bakterienkolonien innerhalb des Nährbodens nachweisbar. Die mit dem 72- und 96-stündigem 37°-Speichel verarbeiteten Agarnährböden erwiesen sich frei von Bakterien.

Der reiche Bakteriengehalt des frisch verarbeiteten Speichels und die verringerte Keimzahl nach längerem Lagern konnte vergleichsweise kenntlich gemacht werden durch durch Zusatz von 0,02 % tellurigsaurem Natrium zum Cystin-Agar. Die im Speichel-Agar vorhandenen Mundbakterien reduzierten Natrium-Tellurit zu schwarzem Tellur. Die mit dem Frischspeichel verarbeiteten Agarnährböden

waren deutlich schwarz gefärbt; weniger starke Reduktion innerhalb des Agars war bei den 0°-Speichelplatten zu verzeichnen, während keine, bzw. äußerst geringe Schwärzung des 37°-Speichelagars erkannt werden konnte. Der inaktivierte Speichelagar und ein Kochsalz-Cystin-Agarnährboden, die als Kontrolle dienten und ebenfalls mit 0,02 % tellurigsaurem Natrium versetzt worden waren, wiesen innerhalb des Agars auch keine Schwärzung auf. Tabelle XIII läßt die Versuchsergebnisse erkennen.

Tabelle XIII.

Kolonienwachstum innerhalb des Speichelagars nach 24-stündiger Bebrütung.

Sp.	frischer Rohspeich.	0°-Speichel			37°-Speichel			Kontrolle: 37°-Speichel inaktiviert			Kontrolle: NaCl-Agar		
	24 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
W.	++++	+++	+++	++	±	±	0	0	0	0	0	0	0
N	++++	+++	+++	+++	+	±	±	0	0	0	0	0	0
S.	++++	+++	++	+	±	±	0	0	0	0	0	0	0

Tabelle XIII. Ein Teil des Speichels wurde vor der Verarbeitung mit Agar 24 Std., 48 Std. und 72 Std. bei 0°, ein anderer Teil bei 37° gehalten. Auch wurde roher Speichel sofort zu Speichel-Agarnährböden verarbeitet.

Zusammenfassung.

Die bisherigen Versuchsergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1. Rohspeichel, zu 50 % mit Agar vermischt, ließ bei allen Versuchsreihen, verschiedenen Bakterienarten gegenüber stets entwicklungshemmende bis bakterizide Wirkung erkennen. Die Stärke der Wirkung war individuell verschieden. Auch konnten bei derselben Person Schwankungen in der Wirksamkeit des Speichels beobachtet werden. Die Widerstandsfähigkeit der aufgeimpften Stämme war ebenfalls unterschiedlich; es ließen sich

besonders resistente Keime auch von gut wirksamen Speicheln nicht völlig unterdrücken. Das gilt besonders für die Diphtheriebazillen. Die 3 Typen der Diphtherie-Bazillen: gravis, mitis und intermedius zeigten in Bezug ihrer Resistenz gegenüber der antibakteriellen Wirkung des Speichels keinen Unterschied.

2. Gänzlich unterdrückbar im Wachstum waren Milzbrand- und Subtilisbazillen, sowie Streptokokken. Keime, die für den Menschen mehr saprophytischer Natur sind, wie Staphylokokken, Micrococcus tetragenes, Bacterium prodigiosum, B. coli, B. Proteum erwiesen sich dem Speichel gegenüber am widerstandsfähigsten.
3. Die Speichelwirkung war bei 37° am ausgeprägtesten.
4. Der Speichel wirkte bei längerem Stehen antibakteriell auf seine eigenen Bakterien.
5. Das im Speichel wirksame Agens verlor nach 96-stündigem Lagern seine Wirksamkeit nicht. Der bei 0° gleichlange gehaltene Speichel erfuhr eine Herabsetzung seiner Wirksamkeit gegenüber dem Frischspeichel.
6. Die antibakterielle Eigenschaft des filtrierten Speichels war bei der hier geübten Versuchsanordnung aufgehoben. Der filtrierte Speichel besaß aber auch bei dieser Versuchsanordnung noch die Fähigkeit der Umwandlung.
7. Das im Speichel wirksame Agens ließ sich durch Aufkochen, sowie durch $^1/_2$stündiges Erhitzen bei 56° inaktivieren.

II.

Zur Frage des im Speichel wirksamen Stoffes.

Die vorher geschilderten wiederholten Untersuchungen über die Wirkung frischen menschlichen Speichels auf verschiedene Bakterienarten hatten ergeben, daß stets ein antibakterieller Einfluß auf die aufgeimpften Keime zu verzeichnen ist. Im Gegensatz zu der antibakteriellen Wirkung des frischen, unfiltrierten Speichels stand die Unwirksamkeit des durch Hitze inaktivierten sowie des filtrierten Speichels.

Der Zweck der neuen Untersuchung war nun, Aufschluß über die Natur des antibakteriellen Agens zu erhalten oder wenigstens den einen oder anderen in Betracht kommenden Faktor mit Sicherheit auszuschalten. Dazu ist auf Grund eigener Untersuchungen und Angabe aus der Literatur zunächst folgendes zu bemerken[10]):

Der frisch entleerte Speichel enthält neben Eiweiß aus den serösen Drüsen, Schleim aus den Schleimdrüsen, Ptyalin, Speichelkörperchen, in Spuren Rhodankalium oder Rhodannatrium.

An anorganischen Salzen sind nachweisbar: Chlornatrium, Chlorkalk, doppelkohlensaure Alkalien, doppelt kohlensaurer Kalk, phosphorsaure Alkalien und Erden, Spurren von Ammoniak.

An Gasen: 0,6 % O
64,7 % CO_2
0,8 % N

Der rohe Speichel, bald mehr bald weniger schleimhaltig, scheidet beim Stehen kohlensauren Kalk ab, der vorher als Bikarbonat in Lösung war.

Zellige Bestandteile im Speichel werden bei der Sedimentierung mitgerissen. So findet sich über dem Bodensatz eine fast klare Flüssigkeit. Die frisch gegossenen Speichel-Agarplatten sind trübe, von leicht opakem Aussehen. Bei mikroskopischer Betrachtung sind im Frischspeichel-

Agar, sowie in dem mit inaktiviertem Speichel hergestellten Agargemisch kristallähnliche Gebilde zu erkennen, herstammend von dem ausgefallenen kohlensauren und phosphorsauren Kalk. Nach 24stündiger, oft auch erst nach 48—72stündiger Bebrütung treten neben diesen organischen Substanzen im Rohspeichel-Agar verschiedene große, scharf umrandete Bakterienkolonien auf. Das gleiche Bild, nur weniger Kolonien enthaltend, bietet sich bei Betrachtung des inaktivierten Speichel-Agars, während die Kolonien im Kochspeichel-Agar gänzlich vermißt werden.

Der mit Hilfe des Seitz-Filters filtrierte Speichel ist wasserhell, enthält keine zelligen Bestandteile. Die Fällungs- und Farbreaktionen auf Eiweiß fallen, im Gegensatz zum unfiltrierten Speichel, zunächst negativ aus. Nur nach Einengung des Filtrates im Exiccator gelang es noch Spuren von Eiweiß und Ptyalin nachzuweisen. Die Eisenchloridreaktion auf Rhodankalium ist wie im unfiltrierten Speichel positiv. Das Speichelfiltrat ist keimfrei.

Die Rhodansalze, denen häufig keimtötende Eigenschaft zugesprochen wurde [11]), können wegen ihrer Anwesenheit im unwirksamen Filtrat, als im Speichel nicht wirksamer Bestandteil ausgeschaltet werden. Zudem ist das Rhodankalium, bzw. das Rhodannatrium im Mundsekret nur in Spuren vorhanden.

Der Ausfall der Speichelwirkung des durch Hitze und durch Filtrieren entkeimten Speichels konnte auf den Fortfall der Bakterien bezogen werden und führte zu der Annahme, daß der Bakterienantagonismus bei der Wirkung des Frischspeichels eine Rolle spielen könnte [11]) [12]).

Frischspeichel verschiedener Personen auf Blut-Agar ausgestrichen, ergab nach 24stündiger Bebrütung reichliches Bakterienwachstum. Stets konnten Staphylokokken, sowie Kokken indifferenter Art, festgestellt werden. In manchen Speicheln waren wechselnd catarrhalische Mikrokokken, Diplokokken, verschiedene Bacterien aus der Gruppe der Heubazillen und hämolytische Streptokokken nachweisbar.

Zur Untersuchung der hemmenden Wirkung des Bakterienantagonismus im Speichel sind zwei Wege gewählt worden:

1. Die Prüfung der Wirkung eines künstlich mit Bakterien infizierten Kochsalz-Agars, bzw. Speichelfiltrat-Agars.
2. Die Prüfung der Wirksamkeit des Rohspeichels nach Ausschaltung oder Herabsetzung des natürlichen Bakteriengehaltes.

ad 1.) Um dem Speichelagar angenäherte Bedingungen zu schaffen, wurde je eine Aufschwemmung von 5 ccm physiologischer Kochsalzlösung mit je einer Oese der Agarkulturen von B. Proteus, B. coli und von Staphylokokken, die als typische Bakterienantagonisten gelten, mit der gleichen Menge auf etwa 50° abgekühltem Cystin-Agar vermischt und zu Platten gegossen. Die mit den genannten Bakterien infizierten, erstarrten und getrockneten Nährböden wurden mit Diphtheriestämmen beimpft. Als Kontrollen dienten bakterienfreie Kochsalz-Agarplatten, die ebenfalls mit Diphtheriestämmen beimpft wurden. Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° waren innerhalb des Agars unzählige Kolonien nachweisbar. Das Wachstum der aufgeimpften Diphtheriebazillen war wohl auf allen drei Bakterienplatten verringert, jedoch nicht aufgehoben, während die aufgeimpften Diphtheriekeime auf den bakterienfreien Kochsalz-Nährböden normales Wachstum entfalteten. B. Proteus, B. coli und Staphylokokken gestatten also noch mäßig gutes Wachstum der auf die Nährböden geimpften Diphtheriestämme, obgleich die dem Agar eingeimpfte Menge die Anzahl der natürlicherweise im Speichel vorhandenen Keime bei weitem übertraf. (Tab. XIV).

Tabelle XIV.

Di.-Stamm	NaCl-Agar + Proteus			NaCl-Agar + Coli			50% phys. NaCl-Agar + Staphylok.			NaCl-Agar-Kontrolle		
	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
Typ gravis 189	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++++	++++	++++
Typ gravis 190	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++++	++++	++++

Um festzustellen, ob die wachstumshemmende Wirkung des Speichels, die ja bei verschiedenen Personen verschieden stark ausgeprägt ist, auf die antagonistische Wirkung ganz bestimmter im Speichel vorhandener Bak-

terien zurückzuführen ist, wurden zunächst die gesamten Bakterien der Mundflora einzelner Personen in ähnlicher Weise in filtriertem Speichel sowie in physiologische Kochsalzlösung eingesät.

Kleine Mengen frischen Speichels verschiedener Personen wurden in je 5 ccm sterile Bouillon gebracht und 24 h bei 37,0 gehalten. 5 ccm Speichelfiltrat wurden mit 0,5 ccm der bebrüteten, infolge Bakterienwachstums, stark getrübten Bouillon versetzt und zu gleichen Teilen mit Cystin-Agar vermischt, zu Platten gegossen. Diese Nährböden, sowie eine Kochsalz-Agarkontrolle und eine Speichelfiltrat-Agarkontrolle wurden mit Diphtheriestämmen, Milzbrand- und Subtilisbazillen beimpft. Nach der Bebrütung wies der bakterienhaltige, mit zahlreichen Keimen durchsetzte Filtrat-Speichelagar wenig herabgesetztes Wachstum der aufgetragenen Keime auf, während im Gegensatz hierzu die antibakterielle Eigenschaft der entspresprechenden gleichzeitig beimpften Rohspeichel-Agarnährböden, die ebenfalls mit zahlreichen Keimen durchsetzt waren, deutlich hervortrat. Die bakterienfreien Filtrat-Speichelagarplatten, sowie die Kochsalz-Agarkontrollnährböden waren üppig bewachsen. Tabelle XV. läßt die Versuchsergebnisse erkennen, die aus der Wirkung des infizierten Filtrat-Speichelagarnährbodens auf Bakterienkeime gewonnen wurden.

Tabelle XV.

Wirkung des künstlich mit Mundbakterien infizierten Speichelfiltrates auf aufgetragene Bakterienkeime.

Sp.	Stamm	Rohspeichel-Agar			Filtratsp.-Agar + Bakterien			Kontrolle: Filtrat Speichel-Agar			Kontrolle: NaCl-Agar		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
W.	Subtilis	0	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Milzbrand Di. 17	0	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	+++	++++	++++	++++
	Typ gravis Di. 36	0	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Typ mitis	0	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
N.	Subtilis	0	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Milzbrand Di. 17	0	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Typ gravis Di. 36	0	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Typ mitis	0	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Da man die Ansicht vertreten könnte, daß die antibakterielle Wirkung des Speichels an besondere in der Mundhöhle vorhandene, stark antagonistisch wirkende Bakterien gebunden wäre und daß der Unterschied in der Wirksamkeit des Speichels bei verschiedenen Personen auf dem Vorhandensein solcher Bakterien beruhte, wurden verschiedene Bakterienarten der zu untersuchenden Speichel isoliert und in Reinkultur gezüchtet, um sie auf ihre antagonistische Eigenschaft zu untersuchen. Zu diesem Zwecke wurde Speichel auf Blut-Agarnährböden ausgestrichen (Hammelblut 8 %, Agar 3 %ig). Nach 24stündiger Bebrütung bei 37° wurden die verschiedenen, auf dem Nährboden gewachsenen Kolonien Staphylokokken, Streptokokken und Heubazillen auf eine neue Blut-Agarplatte verimpft. Nach weiterer 24-stündiger Bebrütung wurde je eine Oese der verschiedenen in Reinkultur gezüchteten Bakterien aufgeschwemmt und in je 5 ccm Bouillon 24 h bei 37° gehalten. Nach der Bebrütung wurden je 5 ccm physiologische Kochsalzlösung mit 0,5 ccm der bebrüteten bakterienhaltigen Bouillon versetzt und zu 50 % mit flüssigem, auf 50° abgekühltem Cystin-Agar vermischt, zu Platten verarbeitet. Die Nährböden wurden gleich nach dem Erstarren mit Diphtheriestämmen beimpft. Nach 24stündiger Bebrütung waren die Agarplatten im Innern massenhaft mit Kolonien der eingeimpften durchsetzt. Das Wachstum der aufgeimpften Diphtheriebazillen war auf den Heubazillen- und Staphylokokkenplatten mehr oder minder gehemmt, während die Streptokokkenplatten so gut wie keinen hemmenden Einfluß ausübten (Tabelle XVI).

Tabelle XVI.

Wirkung des künstlich mit Heubazillen, Staphylokokken und Streptokokken infizierten Kochsalz-Agarnährbodens auf aufgetragene Diphtheriebazillen.

	Di.-Stamm	phys. NaCl-Agar + Heubazillen			phys. NaCl-Agar + Staphylok.			phys. NaCl-Agar + Streptokokken			phys. NaCl-Agar-Kontrollen		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
B.	Typ gravis 119	0	0	0	+	+	+	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	Typ gravis 280	0	0	0	+	+	+	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	Typ gravis 77	0	0	0	+	+	+	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	Typ mitis 36	0	0	0	+	+	+	+++	+++	+++	++++	++++	++++
M.	Typ gravis 119	±	+	+	0	0	+	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	Typ gravis 280	±	+	+	0	+	+	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	Typ gravis 77	±	+	+	0	0	0	+++	+++	+++	++++	++++	++++
	Typ mitis 36	±	+	+	±	+	+	+++	+++	+++	++++	++++	++++

Aus den geschilderten Versuchsreihen über die mögliche Wirkung des Bakterienantagonismus geht hervor, daß die künstlich mit Bakterien infizierten Kochsalz-Agarnährböden, sowie Nährböden, die mit künstlich infiziertem Speichelfiltrat versetzt waren, geringere antibakterielle Fähigkeit gegenüber aufgeimpften Keimen aufwiesen, als der Frisch-Speichelagar. Aus der Mundflora isolierte Bakterienkeime, die in Reinkultur den Nährböden zugesetzt waren, um festzustellen, ob bestimmte Bakterienarten der Mundflora die Wirksamkeit des Rohspeichels bedingen, gen, zeigten unterschiedliche Wirkung. Heubazillen und Staphylokokken entfalteten gut hemmende Fähigkeit, während Streptokokken, obgleich auch in reichlicher Menge eingesät, fast keine antagonistische Wirkung entfalteten. Nun wurden aber Heubazillen nur zum Teil in den zur Untersuchung gelangten wirksamen Speicheln nachgewiesen, wohl aber wurden stets Staphylokokken und Streptokokken gefunden. Daraus würde sich ergeben, daß im Speichel hauptsächlich Staphylokokken auf Bakterien antagonistisch wirken, nur sind im Speichel die Staphylokokken nicht an-

nähernd so zahlreich vorhanden, wie bei diesen Versuchen in dem künstlich infizierten Agar. Infolgedessen haben auch die mit der Gesamtmundflora versetzten Nährböden eine sehr geringe hemmende Wirkung erkennen lassen.

Nach den Untersuchungsergebnissen scheint also der Bakterienantagonismus mit beteiligt zu sein an der Abwehr pathogener Keime. Aber auch einem thermolabilen Körper im Speichel ist antibakterielle Eigenschaft zuzuschreiben. Denn der Speichel verlor durch $^1/_2$stündiges Erhitzen bei 56° seine keimhemmende, bzw. keimtötende Fähigkeit. Der mit diesem so inaktivierten Speichel vermischte Agar wies aber nach 24stündiger Bebrütung bei Körpertemperatur stets noch Bakterienwachstum innerhalb des Nährbodens auf. Auch müßte, wäre eine Speichel-Bakterizidie nur auf Bakterienantagonismus zurückzuführen, der weniger wirksame Speichel sich durch geringeren Bakteriengehalt auszeichnen. Daraufhin untersuchte Mundsekrete konnten diese Annahme nicht bestätigen. Gut antibakteriell wirkende Speichel mit geringem Bakteriengehalt gelangten zur Untersuchung neben wenig hemmenden Speicheln mit sehr reichlichem Bakteriengehalt.

ad 2.) Um in anderer Weise dem Einwand des Bakterienantagonismus zu begegnen, wurde versucht, einen möglichst keimfreien frischen, unfiltrierten Speichel zu erhalten.

Der durch Filtration mit Hilfe des Seitz-Filters unter Stickstoffdruck von 2 atü entkeimte Speichel erwies sich bei der geschilderten Versuchsanordnung als ungeeignet, da dieser infolge Adsorption seine Eiweißstoffe bis auf geringste Spuren eingebüßt hatte. So wurden Speichelproben eine Stunde lang bei einer Tourenzahl von 16000 U/Min. zentrifugiert. Der von dem Bodensatz steril abpipettierte wasserhelle Speichel wurde in üblicher Weise mit Cystig-Agar zu Platten verarbeitet. Die Nährböden wurden mit verschiedenen pathogenen Stämmen beimpft. Die aufgeimpften Keime wuchsen ebenso üppig, wie auf dem Kochsalzkontroll-Agar.

Der Speichel hatte somit seine Wirksamkeit verloren. Aber auch der nach dem Zentrifugieren wieder aufgeschüttelte Speichel wies keine antibakterielle Wirkung mehr

auf. Also lag der Grund für die Unwirksamkeit des zentrifugierten Speichels nicht in dem Verlust der im Bodensatz befindlichen Stoffe und Bakterien. In Tabelle XVII ist der unwirksame klare zentrifugierte Speichel und der aufgeschüttelte zentrifugierte Speichel dem wirksamen, nicht zentrifugierten Speichel gegenübergestellt.

Tabelle XVII.

Wirkung des zentrifugierten und des unveränderten Rohspeichels auf Bakterienkeime.

Sp.	Stamm	Rohspeichel Agar			zentrifug. Speichel + Agar			aufgeschütt. zentrifug. Speichel + Agar			NaCl-Agar Kontrolle:		
		24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h	24 h	48 h	72 h
W.	Di.-17	0	0	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Milzbrand	0	0	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
N.	Di.-343	0	0	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Di.-357	0	0	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Di.-18	0	0	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++
	Di.-29	0	0	0	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Nun sollte die Ursache ergründet werden, weshalb wohl der zentrifugierte Speichel seine antibakterielle Wirksamkeit eingebüßt hatte. Der Verdacht lag nahe, daß eine hohe Wärmeentwicklung während des Zentrifugierens den Speichel inaktiviert haben könnte. Begründet war die Vermutung durch die Beobachtung, daß auch der nach dem Zentrifugieren wieder aufgeschüttelte Speichel unwirksam blieb. Benutzt wurde eine Zentrifuge „Ecco Super Rapid" mit Luftkühlung. Die Tourenzahl betrug 16000 U/Min. Die Zentrifugenröhrchen bestanden aus Metall. Um die, bei der hohen Umdrehungsgeschwindigkeit, entstehenden Reibungswärme in den Zentrifugenröhrchen zu ermitteln, genügt nicht die Feststellung der Anfangs- und Endtemperatur, da die Zentrifuge, von der Zeit der Ausschaltung ab gerechnet, etwa 4 Minuten braucht, um zur Ruhe zu kommen. Während dieser Zeit aber kühlt, bei der abnehmenden Geschwindigkeit, die in den Zentrifugenröhrchen erwärmte Flüssigkeit schnell ab, da erstens

1. das umgebende Metall die Wärme gut leitet und
2. eine bewegte Flüssigkeit sich schneller abkühlt.

Die sofort gemessene Endtemperatur betrug noch 34° C.

bei einer Anfangstemperatur von 20 ° C. Eine meßtechnische Methode zur Ermittlung der während des Rotierens entstehenden Wärme ist nicht bekannt. Ein Maximalthermometer kann nicht eingelegt werden, da die Quecksilbersäule, unter dem Einfluß der Zentrifugalkraft, garnicht erst zur Wirkung zu gelangen vermag.

So wurden zur Feststellung der während des Zentrifugierens sich entwickelnden Temperatur Substanzen mit unterschiedlichem Schmelzpunkt benutzt. Chemisch reines Paraffin, dessen Schmelzpunkt bei 54 ° C liegt, sowie reines Bienenwachs, dessen Schmelzpunkt bei 64 ° C lag, wurden sowohl in Spänen als auch in Form von kleinen Würfeln in je ein Metall-Zentrifugenröhrchen gelegt. Nach einstündigem Zentrifugieren füllten diese Substanzen die Kuppe der Zentrifugenröhrchen, als homogene Masse, aus. Sie waren also geschmolzen. Die Oberfläche der Paraffinsubstanz und der Wachsspanmasse waren glatt; nur die zusammengeschmolzenen Wachswürfel ließen leichte Konturen erkennen. Alle Substanzen konnten erst nach Erwärmen herausgelöst werden.

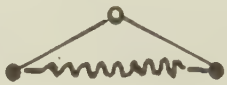
Ferner wurden unterschiedliche Legierungen aus Zinn, Blei und Wismut zusammengestellt, deren Erweichungsbeginn im Wasserbad bei 50 °, 60 °, 64 ° C festgestellt worden war. Kleinere Stücke dieser Legierungen wurden in die metallenen Zentrifugenröhrchen gelegt; nach einstündigem Zentrifugieren füllten diese Legierungen die Kuppe der Behälter als geschmolzene Masse vollständig aus.

Die Oberflächen waren absolut glatt, bis auf die Oberfläche derjenigen Legierung, deren Erweichungspunkt bei 64 ° C ermittelt worden war. Hier waren an der Oberfläche noch Konturen einzelner Teile erkennbar. Diese geschmolzenen Legierungen konnten ebenfalls nur nach Erwärmen der Metallröhrchen aus denselben herausgelöst werden.

Der Schmelzpunktt dieser Wärmeprüfer wird unter dem Einfluß von Druck nicht erniedrigt, da Paraffin, Bienenwachs, sowie die benutzten Legierungen beim Schmelzen ein größeres Volumen einnehmen.

Zur weiteren Ermittlung der entstehenden Wärme im Innern der Zentrifugenröhrchen dienten kleine Drahtbügel, zwischen deren Schenkeln eine dünne Neusilberdraht-Spi-

rale mit einer leicht schmelzenden Legierung, unter Zugwirkung, festgelötet wurde.



Im Wasserbad wurde jeweils die Temperatur festgestellt, unter der, nach Einwirkung der Wärme auf die verschiedenen Metalllegierungen, die Spirale abriß. Einige Befestigungen lösten sich bei 50° andere bei 56°, 60°, 63° bzw. 65° C.. Die Drahtbügel wurden in dem mit ungefähr 5 ccm Wasser gefüllten Zentrifugenröhrchen an einem Draht hängend befestigt. Nach einstündigem Zentrifugieren waren ren alle Neusilberdraht-Spiralen abgeschmolzen, mit Ausnahme derjenigen, die im Wasserbad bei 65° C abgelötet worden war. Die Versuche wurden mehrfach wiederholt.

Nach einstündigem Zentrifugieren bei 16000 U/Min. erreichte also eine in den Metallröhrchen befindliche Flüssigkeit eine Temperatur von 64° C. Der zentrifugierte Speichel hatte somit seine Wirksamkeit in gleicher Weise eingebüßt, wie der im Wasserbad bei 56° C $^1/_2$stündig erhitzte Speichel. Die Methode des Zentrifugierens war somit nicht brauchbar.

Wie angeführte Versuche gezeigt haben, wurden die in dem Speichel befindlichen Bakterien durch 96stündigem Aufenthalt im Brutschrank bei 37° zur Abtötung gebracht. Die dabei sich entwickelnde Fäulnis des Speichels konnte durch Einlegen eines Kupferstückes infolge der oligodynamischen Wirkung dieses Metalles unterdrückt werden.

Frisch entleerte Speichel wurden bei 37° und zur Kontrolle bei 0°, über 24 Std., 48 Std. und 96 Std. gehalten. Der Speichel nahm an Bakterien so stark ab, daß er nach 96stündigem Stehen wenig oder gar keine Keime mehr enthielt. Dieser bakterienarme oder bakterienfreie Speichel hatte aber seine antibakterielle Wirksamkeit nicht eingebüßt. Die mit einem derartigen Speichel hergestellten Agrarnährböden sahen nach 24stündiger Bebrütung, bei mikroskopischer Betrachtung, vollständig leer aus. Der bakterienfreie, frisch gegossene Speichel-Agar entfaltete auf-

geimpften pathogenen Stämmen gegenüber, nach Bebrütung bei 37°, eine ebenso gute antibakterielle Wirkung, wie die zur Kontrolle herangezogenen Frischspeichel-Agarnährböden. Auch verlor der bakterienfreie Speichel seine antibakterielle Wirkung wieder, durch $^1/_2$ stündiges Erhitzen bei 56°. Kupferwirkung auf die aufgeimpften Bakterien war bei diesem Befund also auszuschließen.

Die ausgeführten Versuche sprechen gegen eine alleinige Wirkung des Bakterienantagonismus und für einen wachstumshemmenden bis bakterizid wirksamen, an Eiweiß gebundenen, durch Erhitzen zerstörbaren Stoff im Speichel.

Daß frischer Speichel die Fähigkeit besitzt, virulente echte Diphtheriebazillen einer Einzel-Kultur in diphtheroide Stäbchen und weiterhin in Pseudodiphtheriebazillen umzuwandeln, hatten Dold und Weigmann experimentell nachgewiesen. Diese Fähigkeit des Speichels ist auch dem filtrierten, keimfreien Speichel noch zuzuschreiben und spricht also ebenfalls gegen eine alleinige Wirkung des Bakterienantagonismus.

Zusammenfassung.

1. Frischer menschlicher Speichel wirkt wachstumshemmend auf pathogene und auf apathogene Keime. Jedoch ist die Tiefe der antibakteriellen Speichelwirksamkeit bei verschiedenen Personen und den verschiedenen Keimen gegenüber unterschiedlich.
2. Die Speichelwirkung ist bei 37° am ausgeprägtesten.
3. Die keimhemmende Wirkung des Speichels wird durch Erhitzen aufgehoben.
4. Der Antagonismus der Mundhöhlenbakterien verursacht nicht allein die keimhemmende Wirkung des Speichels. das beweist
   a) die unveränderte antibakterielle Wirkung des keimarmen Speichels, sowie die umwandelnde Fähigkeit des filtrierten Speichels.

b) die geringe keimhemmende Wirkung der künstlich mit Mundhöhlen- und verschiedenen anderen Bakterien infizierten Nährböden.

5. Es ist anzunehmen, daß die antibakterielle Eigenschaft des menschlichen Speichels an thermolabile eiweißartige Körper gebunden ist.

Literaturverzeichnis

1. Dold und Weigmann: Z. Hyg. 116; 146 (1934.)
2. Dold und Weigmann: Z. Hyg. 116; 154 (1934.)
3. Sanarelli und Florain: Zit. im Handb. d. pathog. Mikroorg. Bd. I. S. 255, 724.
4. Hugenschmidt, Krüger, v. d. Reis: Zit. im Handb. d. pathog. Mikroorg. Bd. II. S. 355 f. f
5. Seitz: Bakteriologie f. Zahnärzte. 2. Aufl., Berlin u. Leipzig. (Walter de Gruyter u. Co.) 1930.
6. Bordet, Marguerite: C. r. Soc. Biol. Paris 99, 1252 bis 1254 (1928.)
7. Fleming, A.: Proc. roy. Soc. s. B., 93 Nr. 653, 306 bis 317 (1922); Ref. Zbl. Hyg. 3; 268 (1923.)
8. Dold und Weigmann: Z. Hyg. 116; 158 (1934.)
9. Weigmann und Koehn: Z. Hyg. 118; 507 u. 516 (1936.)
10. Pflüger, E.: Pflügers Archiv f. d. gesamte Physiologie 1, 1868; 686.
11. Clauberg: Zbl. Bakteriol. I. Orig. 134 96–99 (1935.)
12. Besta und Kuhn: Z. Hyg. 116; 520 (1934).

Lebenslauf.

Am 11. August 1905 wurde ich als Tochter des Ingenieurs Reinhold Noeske und seiner Ehefrau Sophie Noeske geb. Mertz zu Berlin geboren. Am 6. März 1930 bestand ich nach 5-monatigem Hospitieren das Abiturienten-Examen am Luisen-Oberlyceum zu Berlin. Anschließend wurde ich an der Friedrich-Wilhelms-Universität immatrikuliert, wo ich im Frühjahr 1933 das medizinische Vorexamen bestand. Nachdem ich auch die klinischen in Berlin absolviert hatte, bestand ich das medizinische Staatsexamen an der Universität Berlin mit dem Prädikat „sehr gut".

Hildegard Noeske.